

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
(Case No. 99,849-A)

PATENT
RECEIVED

In the Application of:

Leroy.

Serial No.: 09/423,698

Filing Date: November 12, 1999

For: Multivalent Vaccine Composition with Mixed
Carrier



MAR 29 2000

Examiner: TECH CENTER 1600/2900

Group Art Unit:

CLAIM OF PRIORITY

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231



Dear Sir:

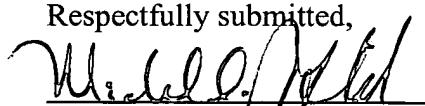
Applicant(s) in the above-identified application, through the undersigned attorney, hereby requests that the above-identified application be treated as entitled to the right accorded by Title 35, U.S. Code, Section 119, having regard to the application, which particulars are set out below:

In France, Application No. FR 97/06210, filed May 14, 1997.

A Certified copy of the priority document and English translation are enclosed.

Date: December 30, 1999

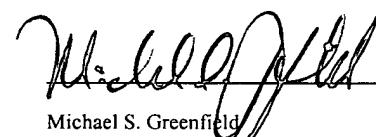
Respectfully submitted,

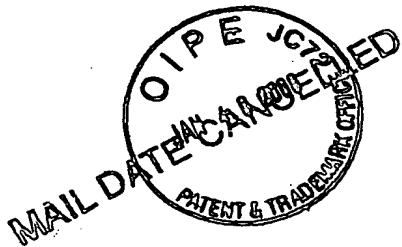

Michael S. Greenfield
Reg. No. 37,142

CERTIFICATE OF MAILING (37 C.F.R. 1.8a)

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to the: Assistant Commissioner for Patents, Washington D.C. 20231, on December 30, 1999

Date: December 30, 1999


Michael S. Greenfield



BREVET D'INVENTION



CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

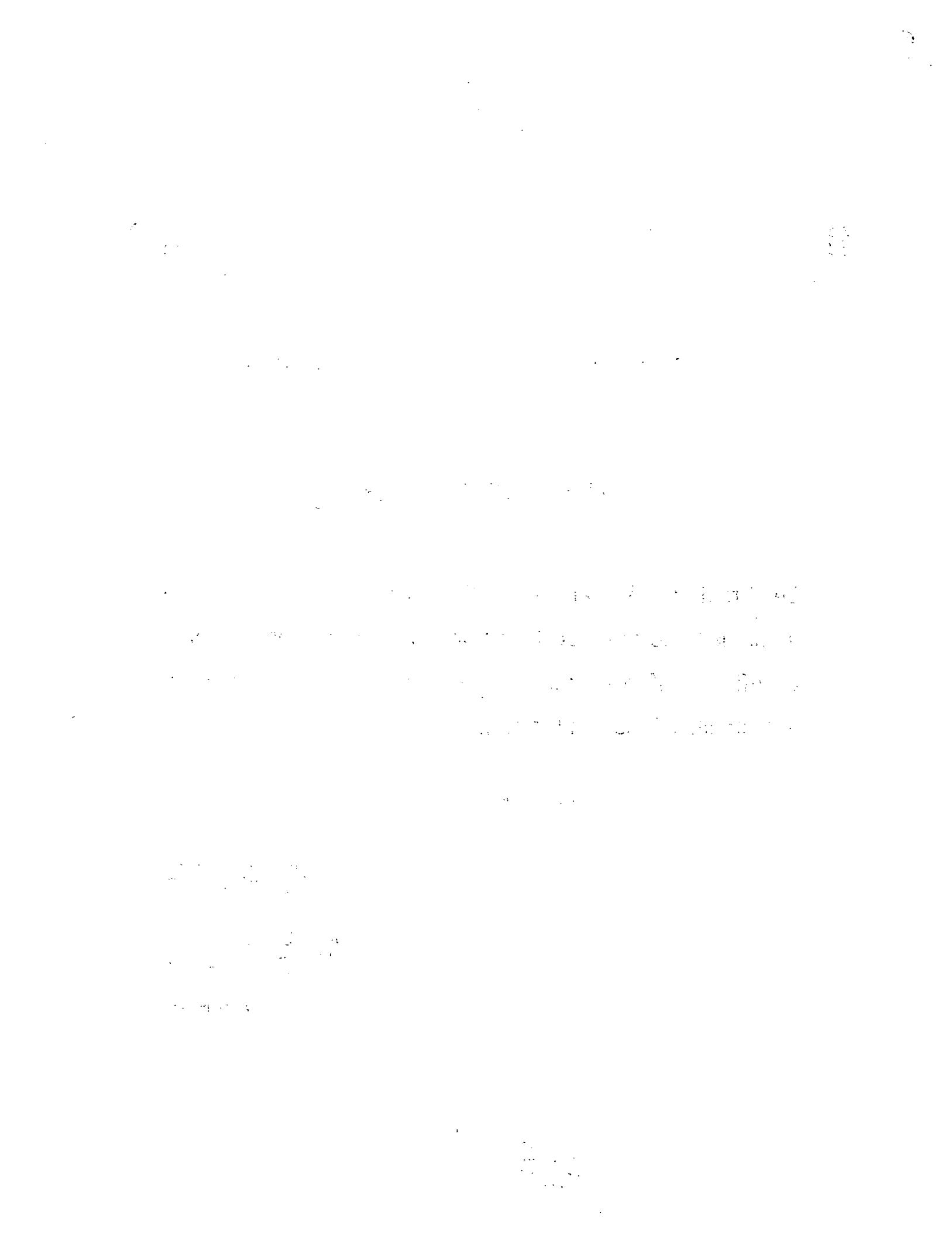
08 NOV. 1999
Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

SIEGE
INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



26 bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES	14 MAI 1997
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	97 06210
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT	67
DATE DE DÉPÔT	14 MAI 1997

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention demande divisionnaire
 certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen



Établissement du rapport de recherche

différé immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Composition vaccinale multivalente à porteur mixte.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 3 4 19 5 0 5 3 7 0 code APE-NAF 2 4 14 C

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

PASTEUR MERIEUX Sérum et Vaccins S.A.

Forme juridique

S.A.

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

Pays

58, avenue Leclerc
69007 LYON

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs oui non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES requise pour la 1ère fois requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

AYROLES Marie-Pauline
Responsable Propriété Intellectuelle

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

D. GIRAUD

**BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT
D'UTILITÉ**

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9 706 210

TITRE DE L'INVENTION :

Composition vaccinale multivalente à porteur mixte

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

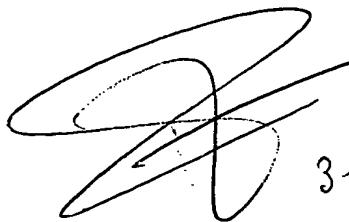
PASTEUR MERIEUX Sérum & Vaccins

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

LEROY Odile
13, Rue des Quatre Vents
92360 GARCHES
FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire



31 Juillet 1998

La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention d'un certain nombre d'infections dues à des agents pathogènes tels que les bactéries, qui comprend à titre d'agent immunogène, des polyosides dérivés d'un ou de plusieurs agents pathogènes.

5

Les bactéries ainsi que les champignons tels que des levures incorporent des polyosides dans leur structure de surface. Ainsi la grande majorité des bactéries sont recouvertes d'un exsudat de nature polyosidique qui est fixé à la bactérie de manière plus ou moins forte mais qui n'est pas à proprement parler une enveloppe. Cet exsudat porte le 10 nom de glycocalyx ou de capsule. D'autre part la membrane externe des bactéries gram-négatives est entre autre constituée de lipopolysaccharide (LPS). Enfin, des polyosides se retrouvent aussi dans la paroi des champignons. Ces polyosides sont en fait des antigènes de surface qui induisent une réponse immunitaire chez un mammifère infecté.

15

De tels polyosides sont constitués sur la base d'unités dans lesquelles les constituants et les liaisons sont définis et qui sont caractéristiques de l'espèce bactérienne ou fongique considérée. Ces unités répétitives contiennent les épitopes, c'est-à-dire les structures déterminantes de l'antigénicité.

20

Les polyosides de microorganismes pathogènes sont réputés être de bons agents vaccinaux. Tels quels ils sont efficaces chez les adultes et les enfants de plus de deux ans. Par contre chez les nourrissons, certains sont peu ou pas immunogéniques et n'induisent pas de réponse immunitaire. Il est possible de surmonter ce problème, en couplant par liaison covalente les polyosides à une protéine dite porteuse telle que l'anatoxine 25 diphthérique ou tétanique, de manière à obtenir un conjugué polyoside - protéine porteuse.

30

Une même composition vaccinale peut contenir plusieurs conjugués. En effet, la tendance veut que l'on rassemble plusieurs agents vaccinaux destinés à prévenir ou à traiter des infections induites par des agents pathogènes d'espèces différentes ; ceci entre autre, afin de limiter le nombre d'administrations dans la vie d'un individu. De plus, au sein d'une même espèce, il peut exister plusieurs sérogroupe / sérotypes largement représentés au plan régional ou mondial. On rappelle qu'un sérogroupe / sérotype est caractérisé entre autres par la nature du polyoside de capsule et que des polyosides de sérotypes différents ne présentent pas de réaction immunologique croisée. Dans ce cas, il peut donc être nécessaire de réunir les polyosides provenant de différents sérotypes, afin de lutter avec efficacité contre une infection due à une seule et même espèce.

Ainsi, cela est par exemple le cas lorsque l'on cherche à vacciner à l'encontre des infections à *Streptococcus pneumoniae*. Les infections à pneumocoques sont un réel problème de santé publique notamment dans la mesure où on les rencontre dans les formes 5 sévères de pneumonies, de septicémies et de méningites. Dans les pays industrialisés, elles affectent chaque année 30 à 100 per 100,000 enfants de moins de trois ans. Le taux de mortalité dans les cas de bactéricémies et de méningites est de 15 à 30 % tandis que 5 % des enfants meurent de pneumonies.

10 Une étude effectuée en Finlande de 1985 à 1989 montre que 90 % des infections invasives sont dues à 8 groupes de sérogroupes / sérotypes. Les sérogroupes / sérotypes 14, 16 et 19 sont responsables de 54 % des cas, le sérotype 14 étant prédominant chez les enfants de moins de deux ans. D'autres pneumocoques fréquemment isolés appartiennent aux sérogroupes 7, 18 et 23 ; d'autres encore, plus rares appartiennent aux sérogroupes / 15 sérotypes 9 et 4. Une distribution similaire a été mise en évidence dans d'autres pays industrialisés, en particulier aux Etats-Unis.

D'autre part, *Streptococcus pneumoniae* est responsable d'un certain nombre d'otites, infections plus bénignes mais très courantes. On évalue à environ 75 % le nombre d'enfants 20 ayant été atteints d'une otite avant l'âge de six ans et à 30 à 50 % le nombre d'otites dues au pneumocoque. Dans les pays développés, les otites à pneumocoque sont dues au sérotype 19 dans 25 % des cas ; suivis par les sérogroupes / sérotypes 23 (13 %), 6 et 14 (12 %), 9 et 18 (4 %) et 4 et 1 (2 %).

25 Un vaccin pneumocoque contenant les polyosides de 23 sérotypes est déjà commercialisé. Ce vaccin permet de combattre de manière efficace les infections invasives chez les adultes et possède une action transitoire chez les enfants de plus de sept mois.

Les polyosides de capsule du pneumocoque sont des antigènes T-indépendants *i.e.*, 30 ils peuvent induire des anticorps, de préférence du type IgM, sans l'aide des cellules T et ne sont pas capables de promouvoir une réponse rappel de type IgG. Lorsqu'ils sont couplés à une protéine porteuse, ces polyosides se révèlent alors capable d'induire une réponse T-dépendante, tout spécialement chez les nouveaux-nés et confèrent une protection à long terme.

Des études cliniques ont été effectuées en Finlande et en Israël, avec des vaccins pneumocoque à quatre valences contenant des conjugués 6B, 9V, 18C et 23F dans lesquels le polyoside était couplé soit à de la DT ou à de la TT. Les doses étaient de 1, 3 ou 10 µg de polyoside par valence. Chacune de ces formulations a été administrée simultanément 5 avec un vaccin anti - *Haemophilus* (polyribitolphosphate couplé à de la TT ; Act-Hib commercialisé par Pasteur Mérieux Connaught) et un vaccin anti - diphtérie, tétanos, coqueluche (pour la Finlande, D.T.Coq commercialisé par KTL). De plus, ces trois administrations ont été mises en oeuvre accompagnées ou non par une administration simultanée d'un vaccin polio oral ou injectable. Elles ont été répétées deux fois à quelques 10 semaines d'intervalle, puis une fois, un an après la primo-immunisation.

15

Les résultats de ces études tels que rapportés dans le tableau ci-après ont permis de mettre en évidence un effet d'interférence négative de la charge en anatoxines diphthérique et tétanique sur l'induction des anticorps anti-HiB, après la dernière immunisation.

Etude finlandaise	Anticorps anti-HiB en µg/ml
Placebo	11.0
Tetraivalent pneumo	
TT : 1 µg	10.1
3 µg	7.18
10 µg	4.11
DT : 1 µg	11.5
3 µg	12.5
10 µg	7.18

Etude israélienne	Anticorps anti-HiB en µg/ml
Placebo	6.62.
Tetraivalent pneumo	
TT : 3 µg	2.81
DT : 3 µg	4.62

Un effet d'interférence similaire a été observé au cours d'une étude clinique en Islande dans laquelle les nourrissons avaient reçus du Pro HiB it (PRP couplé à de la DT ; 20 Connaught) à la place de l'Act-HiB.

D'une manière plus générale, on prévoit que quelque soit le vaccin à base de conjugués, il existe une charge maximale en DT et en TT ou en toute autre protéine porteuse au-delà de laquelle la réponse immune à l'encontre des polyosides est décroissante. Afin de surmonter le problème que constitue le phénomène d'interférence 5 négative dans les vaccins multivalents composés de conjugués polyosidiques, la présente demande propose d'utiliser non pas une mais au moins deux protéines porteuses afin que la charge maximale en chacune des protéines porteuses ne soit pas atteinte.

C'est pourquoi l'invention a pour objet une composition comprenant "n" conjugués 10 C1 à Cn ; chaque conjugué étant composé d'un polyoside S1 à Sn respectivement et d'une protéine porteuse P1 à Pn respectivement ; "n" étant un nombre égal ou supérieur à 2 ; composition dans laquelle les polyosides S1 à Sn sont identiques ou différents et dans laquelle les protéines porteuses P1 à Pn sont sélectionnées de manière indépendante parmi 15 un groupe constitué de "m" protéines porteuses A1 à Am ; "m" étant un nombre égal ou supérieur à 2 ; à condition qu'au moins une des protéines porteuses P1 à Pn soit différente des autres.

A titre illustratif, on envisage les compositions suivantes :

20 (i) Une composition contenant au moins trois conjugués C1, C2, C3, ... Cn ; de formules S1-P1, S2-P2, S3-P3, Sn-Pn, avec : S1 à Sn identiques entre eux et P1 à Pn toutes différentes entre elles ;

25 (ii) Une composition contenant au moins trois conjugués C1, C2, C3, ... Cn ; de formules S1-P1, S2-P2, S3-P3, Sn-Pn, avec : S1 à Sn tous différents entre eux, P1 et P2 identiques entre elles, P3 à Pn identiques entre elles et P1 et P2 différentes de P3 à Pn ; et

30 (iii) Une composition contenant au moins trois conjugués C1, C2, C3, ... Cn ; de formules S1-P1, S2-P2, S3-P3, Sn-Pn, avec : S1 et S2 identiques entre eux, S3 à Sn identiques entre eux, S1 et S2 différents de S3 à Sn, P1 et P3 identiques entre elles, P2 à Pn, à l'exclusion de P3, identiques entre elles et P1 et P3 différentes de P2 à Pn (-P3).

35 Ainsi, aux fins de la présente invention, les conjugués C1 à Cn nécessairement tous différents entre eux, peuvent l'être deux à deux soit par leur polyoside, soit par leur protéine porteuse ou par leur polyoside et leur protéine porteuse. Selon un mode particulier, les polyosides mis en oeuvre sont tous différents entre eux.

Le nombre "n" de conjugués présents dans une composition selon l'invention est égal ou supérieur à 2, et peut en particulier être égal ou supérieur à 4, 6, 8, 10, 11, 12, 15 ou 20. D'une manière générale ce nombre "n" peut être déterminé par l'homme de l'art en fonction 5 d'un certains nombre de critères notamment liés à la nature même de la composition, aux objectifs que cette composition doit permettre d'atteindre et à la population auquelle cette composition est destinée. Par exemple, dans le cas d'une composition destinée à traiter ou à prévenir des infections à pneumocoque chez le nourrisson, on considère qu'une telle composition pour offrir une protection de bon niveau et à l'échelle mondiale, doit contenir 10 au moins 8, de préférence au moins 10, de manière tout particulièrement préférée au moins 11 valences, pouvant être représentées par au moins 11 conjugués ou plus.

Par "polyoside" on entend un polymère constitué d'une pluralité d'unités osidiques, notamment de plus de quatre unités, quelque soit la longueur de la chaîne osidique et par 15 quelque soit le poids moléculaire moyen du polyoside. Ce terme englobe en particulier celui d'oligoside.

Ainsi que précédemment énoncé, une composition selon l'invention doit mettre en oeuvre au moins deux protéines porteuses. Ces protéines porteuses peuvent être choisies 20 parmi toutes celles couramment en usage dans le domaine des vaccins. Il peut notamment s'agir de l'anatoxine diphthérique (DT), de l'anatoxine tétanique (TT), de la forme mutante non-toxique CRM197 de la toxine diphthérique et de la protéine de membrane externe de type 1 (OMP1) de *Neisseria meningitidis* ou de tout variant, analogue ou fragment de ces dernières ayant conservé la capacité de porteur. Les procédés permettant d'obtenir ces 25 protéines sous forme purifiée sont bien connus de l'homme de l'art. Le terme "protéine" tel que utilisé dans la présente demande s'applique à toute chaîne d'acides aminés, quelque soit la longueur de la chaîne. En particulier ce terme englobe la notion de peptide.

De manière générale, le groupe de protéines A1 à Am dans lequel on sélectionne de 30 manière indépendante les protéines porteuses P1 à Pn, représente donc l'ensemble des protéines possédant un effet porteur. Pour ses besoins personnels, l'homme de l'art peut convenir que son choix se limitera à un nombre défini de protéines et en conséquence il peut définir le groupe à partir duquel il effectuera sa sélection sur la base d'un nombre "m" de composants égal ou supérieur à 2 et au plus égal à "n" ; "n" étant tel que défini ci-avant. 35 En particulier, l'homme de l'art peut déterminer le nombre de protéines porteuses différentes qui est nécessaire en tenant compte de la charge maximale à ne pas dépasser

pour chacune des protéines porteuses. On appelle "charge maximale" la quantité de protéine porteuse au-delà de laquelle on observe une réponse immunitaire diminuée à l'encontre d'un ou des polyosides.

5 En particulier en ce qui concerne l'anatoxine diphthérique et l'anatoxine téstanique, on estime que de manière avantageuse, la quantité de ces protéines présentes dans une dose d'une composition selon l'invention ne doit pas excéder 80 et 25 µg respectivement ; une telle dose étant prévue pour administration chez un mammifère, de préférence un humain. De préférence, la charge en DT est inférieure ou égale à 60 µg. De préférence, la charge en
10 TT est inférieure ou égale à 20 ou 10 µg.

Ainsi, on peut convenir que pour une composition ne mettant en œuvre que deux protéines porteuses différentes, la sélection de ces protéines s'effectuera à partir d'un groupe constitué des protéines A1 et A2. De préférence, A1 et A2 peuvent être l'anatoxine 15 diphthérique (DT) et de l'anatoxine téstanique (TT) respectivement ou vice et versa.

Selon un mode particulier, une composition mettant en œuvre uniquement deux protéines porteuses différentes se caractérise par une répartition équilibrée du nombre de polyosides conjugués à la première protéine porteuse et du nombre de polyosides 20 conjugués à la deuxième protéine porteuse. Par exemple, lorsque "n" est un nombre pair, "n"/2 protéines porteuses P1 à Pn sont A1 et "n"/2 protéines porteuses P1 à Pn sont A2 ou lorsque "n" est un nombre impair, ("n"+1)/2 protéines porteuses P1 à Pn sont A1 et ("n"-1)/2 protéines porteuses P1 à Pn sont A2.

25 Un polyoside utile aux fins de la présente invention peut notamment être un polyoside d'origine bactérienne ou fongique. Il peut notamment s'agir d'un polyoside de *Streptococcus* e.g., *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Salmonella* e.g., *Salmonella typhi*, *Escherichia*, *Shigella*, *Neisseria* e.g., *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus* e.g., *Haemophilus influenzae*, *Moraxella*, *Vibrio cholerae* ou *Mycobacterium tuberculosis*.

35 Au sein d'une composition selon l'invention, les polyosides peuvent provenir d'espèces différentes ou bien tous provenir de la même espèce e.g., de la même espèce bactérienne, éventuellement de sérogroupe / sérotypes différents. Afin d'illustrer cette dernière possibilité on cite une composition selon l'invention destinée à vacciner contre les

infections à pneumocoque, qui contient au moins 8 valences, de préférence 10 ou 11 valences choisies parmi les sérotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F et 23F.

Ainsi, une composition constituant un vaccin pneumocoque comprend 5 avantageusement 10 ou 11 valences *e.g.*, représentées par 10 ou 11 conjugués dans lesquels les polyosides sont tous différents entre eux et dérivent des sérotypes / sérogroupes choisis parmi les sérotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F et 23F de *S. pneumoniae*. Il peut notamment s'agir d'une composition qui comprend 10 ou 11 conjugués sélectionnés parmi :

- le polyoside de sérotype 1 couplé à la TT ou à la DT ;
- 10 - le polyoside de sérotype 3 couplé à la DT ;
- le polyoside de sérotype 4 couplé à la TT ;
- le polyoside de sérotype 5 couplé à la TT ou à la DT ;
- le polyoside de sérotype 6B couplé à la DT ;
- le polyoside de sérotype 7F couplé à la TT ou à la DT ;
- 15 - le polyoside de sérotype 9V couplé à la TT ;
- le polyoside de sérotype 14 couplé à la DT ;
- le polyoside de sérotype 18C couplé à la DT ;
- le polyoside de sérotype 19F couplé à la TT ; et
- le polyoside de sérotype 23F couplé à la TT.

20

Sous un autre aspect, une composition constituant un vaccin pneumocoque peut comprendre 10 ou 11 valences représentées par 12 à 22, notamment 12 à 15 conjugués, dans lesquels les polyosides dérivent des sérotypes choisis parmi les sérotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F et 23F ; composition dans laquelle des conjugués de même 25 valence diffèrent entre eux par la protéine porteuse. Il peut notamment s'agir d'une composition qui comprend :

- le polyoside de sérotype 1 couplé à la TT ;
- le polyoside de sérotype 3 couplé à la DT ;
- le polyoside de sérotype 4 couplé à la TT ;
- 30 - le polyoside de sérotype 5 couplé à la TT ;
- le polyoside de sérotype 6B couplé à la DT ;
- le polyoside de sérotype 6B couplé à la TT ;
- le polyoside de sérotype 7F couplé à la TT ;
- le polyoside de sérotype 9V couplé à la TT ;
- 35 - le polyoside de sérotype 9V couplé à la DT ;
- le polyoside de sérotype 14 couplé à la DT ;

- le polyoside de sérotype 18C couplé à la DT ;
- le polyoside de sérotype 18C couplé à la TT ;
- le polyoside de sérotype 19F couplé à la TT ;
- le polyoside de sérotype 23F couplé à la TT ; et
- 5 - le polyoside de sérotype 23F couplé à la DT.

Un tel polyoside peut être avantageusement extrait du microorganisme selon des procédés conventionnels et purifié de même. Ce polyoside peut être utilisé sous forme brute après extraction / purification. Ou bien encore il peut être fragmenté afin d'obtenir un 10 polyoside de poids moléculaire moyen inférieur à celui du polyoside extrait à l'origine. Un procédé de fragmentation particulièrement avantageux est décrit dans WO 93/7178, incorporé par référence.

Un conjugué dans lequel un polyoside est couplé par liaison covalente à une protéine 15 porteuse peut être obtenu selon des procédés conventionnels bien connus de l'homme de l'art. Il peut être fait usage de linker ou de spacer afin d'assurer la conjugaison. Selon le mode de conjugaison mis en oeuvre, le conjugué qui en résulte peut être un conjugué dans lequel le polyoside est lié à la protéine par une seule fonction chimique (type soleil ou néoglycoconjugué), ou par plusieurs fonctions (types rateau et pelote). Il est à la portée de 20 l'homme de l'art déterminer le mode de conjugaison le plus approprié en fonction de la nature du polyoside et plus particulièrement des groupements chimiques portés par le polyoside qui peuvent être mis en jeu au cours de la réaction de conjugaison.

Une composition selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. 25 En particulier, elle peut être formulée avec un diluent ou un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique *e.g.*, de l'eau ou une solution saline. En outre la composition peut contenir des ingrédients usuels tel qu'un tampon ; un agent conservateur ou stabilisant ; un adjuvant tel qu'un composé d'aluminium *e.g.*, un hydroxyde d'aluminium, un phosphate d'aluminium ou un hydroxy phosphate d'aluminium ; et le cas échéant un excipient de 30 lyophilisation. En général, ces produits peuvent être sélectionnés en fonction du mode et de la voie d'administration et selon les pratiques pharmaceutiques standard. Des porteurs ou des diluents appropriés ainsi que ce qui est indispensable à l'élaboration d'une composition pharmaceutique sont décrits dans *Remington's Pharmaceutical Sciences*, un livre de référence standard dans ce domaine.

Une composition selon l'invention peut être administrée par n'importe quelle voie conventionnelle en usage dans le domaine des vaccins, en particulier par voie systémique *i.e.*, parentérale *e.g.*, par voie sous-cutanée, intramusculaire, intradermique ou intraveineuse ; ou par voie muqueuse *e.g.*, par voie orale.

5

L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois *e.g.* 1, 2 ou 3 fois, après un certain délai d'intervalle. Le dosage approprié varie en fonction de divers paramètres, par exemple du nombre de valences contenues dans la composition, de la nature du ou des polyosides utilisés ou du mode d'administration. A titre indicatif on 10 indique que de bons résultats peuvent être obtenus avec par valence, une dose de polyoside de 0.5 à 100 µg, de préférence de 1 à 50 µg, de manière tout à fait préférée de 1 à 10 µg. Une dose de la composition selon l'invention peut être avantageusement sous un volume de 0.5 à 2 ml.

15

Ci-après on présente à titre d'exemple, différents vaccins pneumocoque à valences multiples ; les valences étant choisies parmi les sérotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F et 23F. Les polyosides issus de ces sérotypes ont été fragmentés selon le procédé décrit dans WO 93/7178. Les polyosides couplés à la DT (sauf le polyoside de type 1), l'ont été selon le procédé de conjugaison décrit dans WO 93/7178. Brièvement, un polyoside est 20 soumis à une amination réductrice en présence de cyanoborohydrure de sodium afin de lier une molécule de diaminohexane à un groupe réducteur terminal. Puis le polyoside ainsi dérivé est activé par un groupe succinimide en utilisant du disuccinimidyl suberate (DSS). Le polyoside ainsi activé est mis à réagir directement avec la protéine porteuse. Le polyoside de sérotype 1 a été couplé à la DT ou à la TT selon le procédé de conjugaison 25 décrit dans le brevet US n° 5,204,098, incorporé par référence. Les autres polyosides couplés à la DT, l'ont été comme suit : Des groupes hydrazide sont incorporés sur le polyoside en faisant réagir le polyoside avec un excès d'acide adipique dihydrazide (ADH) en présence d'éthyl diméthyl amino propyl carbodiimide (EDAC) et de cyanoborohydrure de sodium (pour tous les types sauf le 3) ou simplement en présence de cyanoborohydrure 30 de sodium (pour le type 3). Le polyoside ainsi dérivé est mis à réagir avec la protéine porteuse en présence d'EDAC. Les conditions expérimentales ont été contrôlées de manière à ce que l'on obtienne des conjugués dans lesquels la quantité de protéine soit comprise entre 1 et 4 fois, de préférence 2 fois, la valeur de la quantité de polyoside. Ainsi, pour une dose, 3 µg d'un polyoside particulier sont couplés à environ 6 µg de DT et 1 µg d'un polyoside particulier est couplé à environ 2 µg de TT.

35

La DT et la TT utilisées ont été préparées par détoxification au formaldéhyde à partir des toxines extraites respectivement de *Corynebacterium diphtheriae* et de *Clostridium tetani*.

5 Les formulations contiennent un tampon phosphate (0.475 mg d'ion PO_4^{2-} par dose) et du chlorure de sodium (4.5 mg par dose) et peuvent être adjuvées par de l'hydroxyde d'aluminium (alum) (300 μg d'ion Al^{2+} par dose) et contenir un conservateur tel que le phénoxy éthanol formol. Une dose est sous un volume de 0.5 ml.

10

EXEMPLE 1 : Formulation octavalente

Protéine porteuse	Polyoside	
	Sérotype	Quantité pour une dose
DT	3	3 μg
TT	4	1 μg
DT	6B	10 μg
TT	9V	1 μg
DT	14	3 μg
DT	18C	3 μg
TT	19F	1 μg
TT	23F	1 μg

EXEMPLE 2 : Formulations F3, F4 et F3bis à 11 valences

Protéine porteuse	Polyoside			
	Sérotype / Sérogroupe	Quantité pour une dose de formulation F3	Quantité pour une dose de formulation F4	Quantité pour une dose de formulation F3 bis
TT	1	1	-	1
DT	-	-	3	-
DT	3	3	3	3
TT	4	1	1	1
TT	5	1	-	1
DT	5	-	3	-
DT	6B	10	10	3
TT	6B	-	-	1
TT	7F	1	-	1
DT	7F	-	3	-
TT	9V	1	1	1
DT	9V	-	-	3
DT	14	3	3	3
DT	18C	3	3	3
TT	18C	-	-	1
TT	19F	1	1	1
TT	23F	1	1	1
DT	23F	-	-	3

5 La charge approximative en protéine dans chacunes des trois formulations est comme suit :

	F3	F4	F3 bis
DT	45-50 µg	environ 70 µg	environ 45 µg
TT	8-12 µg	environ 6 µg	10-15 µg

Revendications

5 1. Une composition comprenant "n" conjugués C1 à Cn ; chaque conjugué étant composé d'un polyoside S1 à Sn respectivement et d'une protéine porteuse P1 à Pn respectivement ; "n" étant un nombre égal ou supérieur à 2 ; composition dans laquelle les polyosides S1 à Sn sont identiques ou différents et dans laquelle les protéines porteuses P1 à Pn sont sélectionnées de manière indépendante parmi un groupe constitué de "m" protéines porteuses A1 à Am ; "m" étant un nombre égal ou supérieur à 2 ; à condition qu'au moins une des protéines porteuses P1 à Pn soit différente des autres.

10

15 2. Une composition selon la revendication 1, dans laquelle les conjugués C1 à Cn sont tous différents entre eux soit par leur polyoside, soit par leur protéine porteuse ou par leur polyoside et leur protéine porteuse.

20 3. Une composition selon la revendication 2, dans laquelle les polyosides S1 à Sn sont tous différents entre eux.

25 4. Une composition selon la revendication 1, 2 ou 3, dans laquelle "n" est un nombre égal ou supérieur à 6.

30 5. Une composition selon la revendication 4, dans laquelle "n" est un nombre égal ou supérieur à 10.

6. Une composition selon l'une des revendications 1 à 5, dans laquelle les protéines porteuses P1 à Pn sont sélectionnées de manière indépendante parmi un groupe constitué de deux protéines porteuses A1 et A2.

35 7. Une composition selon la revendication 6, dans laquelle, lorsque "n" est un nombre pair, " $n/2$ " protéines porteuses P1 à Pn sont A1 et " $n/2$ " protéines porteuses P1 à Pn sont A2 ou lorsque "n" est un nombre impair, (" $n+1/2$ ") protéines porteuses P1 à Pn sont A1 et (" $n-1/2$ ") protéines porteuses P1 à Pn sont A2.

8. Une composition selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle les polyosides S1 à Sn sont d'origine bactérienne.
9. Une composition selon la revendication 8, dans laquelle les polyosides S1 à Sn sont tous dérivés de la même espèce bactérienne.
10. Une composition selon la revendication 9, dans laquelle les polyosides sont tous dérivés de l'espèce *Streptococcus pneumoniae*.
11. Une composition selon l'une des revendications 1 à 10, dans laquelle au moins une des protéines porteuses P1 à Pn est l'anatoxine diphthérique (DT) et au moins une des protéines porteuses P1 à Pn est l'anatoxine téstanique (TT).
12. Une composition selon la revendication 11, dans laquelle les protéines porteuses P1 à Pn sont sélectionnées parmi le groupe constitué par la DT et la TT.
13. Une composition selon la revendication 11 ou 12, dans laquelle la quantité de DT est inférieure ou égale à 80 µg.
14. Une composition selon la revendication 11 12 ou 13, dans laquelle la quantité de TT est inférieure ou égale à 25 µg.
15. Une composition selon la revendication 10, qui comprend 10 ou 11 valences représentées par 10 ou 11 conjugués dans lesquels les polyosides sont tous différents entre eux et dérivent des sérotypes choisis parmi les sérotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F et 23F de *S. pneumoniae*.
16. Une composition selon la revendication 15, qui comprend 10 ou 11 conjugués sélectionnés parmi :
 - le polyoside de sérotype 1 couplé à la TT ou à la DT ;
 - le polyoside de sérotype 3 couplé à la DT ;
 - le polyoside de sérotype 4 couplé à la TT ;
 - le polyoside de sérotype 5 couplé à la TT ou à la DT ;
 - le polyoside de sérotype 6B couplé à la DT ;
 - le polyoside de sérotype 7F couplé à la TT ou à la DT ;
 - le polyoside de sérotype 9V couplé à la TT ;

- le polyoside de sérotype 14 couplé à la DT ;
- le polyoside de sérotype 18C couplé à la DT ;
- le polyoside de sérotype 19F couplé à la TT ; et
- le polyoside de sérotype 23F couplé à la TT.

5

17. Une composition selon la revendication 10, qui comprend 10 ou 11 valences représentées par 12 à 22, notamment 12 à 15 conjugués, dans lesquels les polyosides dérivent des sérotypes choisis parmi les sérotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F et 23F ; composition dans laquelle des conjugués de même valence diffèrent entre eux par la protéine porteuse.

10 18. Une composition selon la revendication 17, qui comprend :

- le polyoside de sérotype 1 couplé à la TT ;
- le polyoside de sérotype 3 couplé à la DT ;
- le polyoside de sérotype 4 couplé à la TT ;
- le polyoside de sérotype 5 couplé à la TT ;
- le polyoside de sérotype 6B couplé à la DT ;
- le polyoside de sérotype 6B couplé à la TT ;
- le polyoside de sérotype 7F couplé à la TT ;
- le polyoside de sérotype 9V couplé à la TT ;
- le polyoside de sérotype 9V couplé à la DT ;
- le polyoside de sérotype 14 couplé à la DT ;
- le polyoside de sérotype 18C couplé à la DT ;
- le polyoside de sérotype 18C couplé à la TT ;
- le polyoside de sérotype 19F couplé à la TT ; et
- le polyoside de sérotype 23F couplé à la TT ; et
- le polyoside de sérotype 23F couplé à la DT.

15

20

25